



In the matter of US
Patent Application 09/508238

CERTIFICATE

I, Dr. Arnd Mueller, Technical Translator and Aspirant for Attorneyship of Boeters & Lieck, Bereiteranger 15, D-81541 Muenchen, Germany, do hereby declare that I am conversant with the German and English languages and am a competent translator thereof, and I further certify that the following pages in the English language are a true and correct translation made by me of the document in the German language attached hereto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arnd Mueller".

Dr. Arnd Mueller
Signed this 18 February 2004

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

CERTIFICATE

The BIOTECON Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH in Berlin/Germany filed with the German Patent Office on September 9, 1997 a Patent Application entitled

"Nucleic acid sequences and processes for detecting bacteria of the Pseudomonas genus".

The annexed specimen is a true and exact copy of the original documents of this Patent Application.

The Application has been provisionally given in the German Patent Office the symbols C 12 N, C 12 Q, and C 12 P of the International Patent Classification.

Munich, September 21, 1998
On behalf of
The President of the German Patent Office

(signed) Hoiß

File reference: 197 39 611.9

BOETERS & BAUER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

BEREITERANGER 15
D - 81541 MÜNCHEN

PAe BOETERS & BAUER
BEREITERANGER 15, D-81541 MÜNCHEN

DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPL.-ING. ROBERT BAUER
PHYS. Dr. ENNO MEYER

TELEFON: (089) 65 00 86
TELEFAX: (089) 65 39 62

September 9, 1997

Our reference: 8872

New German Patent Application

BioTECON Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung
und Consulting mbH

Nucleic acid sequences and processes for detecting
bacteria of the *Pseudomonas* genus

The invention relates to nucleic acid molecules for detecting *Pseudomonas*, to a kit and to uses thereof.

General background of the invention

The gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is a widespread bacterium that is pathogenic for humans and that constitutes a major health risk especially to neonates and to people having weakened resistance. Besides its major clinical significance, the antibiotic resistances that are frequently present and the formation of toxins, especially the highly toxic exotoxin A (Woods, D.E. and Iglesias, B.H., Rev. Infect. Dis. 5, 714 - 722 (1983), *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important bacterial causes of cases of food poisoning. Conventional processes require at least 4 days for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*. There is therefore an urgent need for the development of rapid processes for detecting *Pseudomonas aeruginosa* in food and in clinical samples.

In recent years, a number of new methods have been developed for routine use in detecting particular microorganisms. These include immunological processes based on the use of polyvalent or monoclonal antibodies and processes in which nucleic acid probes are used for detection by means of hybridisation to organism-specific nucleic acids. Further methods that have been described are those processes which are based on a specific nucleic acid amplification, with or without a subsequent confirmation reaction by nucleic acid hybridisation. Processes used for the amplification of nucleic acids are, for example, the polymerase chain reaction (PCR) [US Patents 4,683,195; 4,683,202; and 4,965,188], the ligase chain reaction [WO Publication 89/09835], "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], the "transcription based amplification system" [EP 310,229] and the Q β RNA-replicase system [US Patent 4,957,858].

The mentioned nucleic-acid-based processes are so sensitive that, in contrast to conventional microbiological processes, it is possible to dispense with, or considerably curtail, a lengthy increase in quantity of the microorganism being detected from the sample under investigation. Testing for the presence or absence of the microorganism in question is therefore generally concluded within one day when using the mentioned nucleic-acid-based processes, thereby achieving a considerable reduction in time, especially when conventional processes require several days or weeks for detection.

Various PCR-based processes for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* have been described. By amplifying a region of DNA having a length of 369 bp from the exotoxin A gene it has been possible to detect the presence of strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* selectively [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Even though no bacteria of other species were detected using that PCR system, an amplified product was observed in only 96 % of the 130 *Pseudomonas aeruginosa*

strains tested in total. Consequently, that PCR system is of only limited suitability for establishing a rapid process by means of which the presence of all strains of *Pseudomonas aeruginosa* can be detected reliably.

With the aid of a further, recently published process based on a multiplex PCR it has been possible to detect, selectively, fluorescent pseudomonads on the one hand and *Pseudomonas aeruginosa* on the other hand [De Vos et al. (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Using that process, it was possible to detect each of the 150 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* tested in total. It is, however, disadvantageous that the oprL gene used for the selective detection of *Pseudomonas aeruginosa* is also highly conserved in other species of the *Pseudomonas* genus. Thus, the amino acids that are coded for in the region of the binding sites of the primers used by Voss et al. are identical in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. The detection of *Pseudomonas aeruginosa* is accordingly based merely on a few different base pairs caused by the variation in the third position of particular amino acid codons, which on the basis of experience carries a high risk of false-positive and/or false-negative results occurring.

In addition, because of the high degree of conservation of the oprI and oprL genes, the multiplex PCR system described is unlikely to offer a possible means of detecting - for example by the use of various probes subsequently to the PCR reaction - other clinically significant species of the *Pseudomonas* genus, such as, for example, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida* or *Pseudomonas stutzeri*.

An aim of the invention described herein was to establish nucleic acid sequences whose use as primers and/or probes would ensure detection, in as complete a manner as possible, of all representatives of the species *Pseudomonas aeruginosa*. A further aim of the invention was to identify a region of the genome having suf-

ficiently high sequence variability within different species of the *Pseudomonas* genus to allow, optionally, the detection of other species of the *Pseudomonas* genus as well, for example by using different variants of primers and/or probes in the PCR or subsequently to the PCR.

Depending on the size of the group of microorganisms to be detected and the evolutionary relatedness (similarity) of microorganisms to be excluded (that are not to be detected), detection based on differential DNA sequences requires very extensive preliminary work in order to identify suitable DNA sequences that have the desired specificity in the particular case. The invention described herein relates to such DNA sequences, by means of which the rapid detection of bacteria of the *Pseudomonas* genus, especially of *Pseudomonas aeruginosa*, is possible.

Description of the invention

The problem underlying the invention is solved, according to one embodiment, by a nucleic acid molecule that is obtainable by starting from a plurality of strains belonging to, on the one hand, a to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus and, on the other hand, not-to-be-detected bacteria,

- (a) isolating, in a manner known *per se*, genomic DNA from a *Pseudomonas* strain of those groups (first strain),
- (b) amplifying, in a manner known *per se*, the 23S/5S intergenic region, optionally together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (first amplification product),
- (c) in accordance with steps (a) and (b) in each case, isolating genomic DNA using a second, third, . . . and/or n^{th} *Pseudomonas* strain of the bacteria mentioned, amplifying the 23S/5S intergenic region, together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (second, third, . . . n^{th} amplification product),

- (d) determining, in a manner known *per se*, the DNA sequence of amplification products obtained according to (b) and (c), and comparing the DNA sequence of the amplification product according to (b) with the DNA sequence of one or more amplification products according to (c), and
- (e) isolating and obtaining, as a primer or probe, a nucleic acid molecule by means of which the to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus can be distinguished from the not-to-be-detected bacteria of the *Pseudomonas* genus on the basis of differences at at least one nucleotide position in the sequence region of the nucleic acid molecule.

The nucleic acid molecule according to the invention can be obtainable by starting from strains belonging to, on the one hand, to-be-detected bacteria of the *Pseudomonas* genus and, on the other hand, not-to-be-detected bacteria of a genus (genera) other than *Pseudomonas*.

The problem underlying the invention is solved, according to a further embodiment, by a nucleic acid molecule that is obtainable by starting from a plurality of strains belonging to a to-be-detected group and a not-to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus,

- (a) isolating, in a manner known *per se*, genomic DNA from a *Pseudomonas* strain of those groups (first strain),
- (b) amplifying, in a manner known *per se*, the 23S/5S intergenic region, optionally together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (first amplification product),
- (c) in accordance with steps (a) and (b) in each case, isolating genomic DNA using a second, third, . . . and/or n^{th} *Pseudomonas* strain of those groups, amplifying the 23S/5S intergenic region, together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplifica-

tion product (second, third, . . . nth amplification product),

- (d) determining, in a manner known *per se*, the DNA sequence of amplification products obtained according to (b) and (c), and comparing the DNA sequence of the amplification product according to (b) with the DNA sequence of one or more amplification products according to (c), and
- (e) isolating and obtaining, as a primer or probe, a nucleic acid molecule by means of which the to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus can be distinguished from the not-to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus on the basis of differences at at least one nucleotide position in the sequence region of the nucleic acid molecule.

The nucleic acid molecule according to the invention can be obtainable by starting from strains belonging to a to-be-detected group of bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa* and a not-to-be-detected group of bacteria of other species.

The invention relates also to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO 1 or the sequence complementary thereto.

The invention relates also to a nucleic acid molecule of that kind, having a shortened sequence compared with the aforementioned nucleic acid molecule, namely the sequence of the region or in the region of the nucleotide positions 12 to 131.

The invention relates also to a nucleic acid molecule of that kind, having a shortened sequence compared with a nucleic acid molecule of SEQ ID NO 1, namely

- (i) SEQ ID NO 3 or
- (ii) SEQ ID NO 4 or
- (iii) the sequence complementary to each of (i) and (ii).

The invention relates also to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO 2 or the sequence complementary thereto.

A nucleic acid molecule according to the invention may be characterised in that, in respect of its sequence in at least 10 successive nucleotides of its nucleotide chain,

- (i) it is identical to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims or
- (ii) it corresponds to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims in 9 out of 10 successive nucleotides or
- (iii) it corresponds to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims in 8 out of 10 successive nucleotides or
- (iv) it is at least 90 % homologous to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims.

Such a nucleic acid molecule according to the invention can be characterised in that it is from 10 to 250, and preferably from 15 to 30, nucleotides long.

A nucleic acid molecule according to the invention can be characterised in that it is single-stranded or double-stranded.

A nucleic acid molecule according to the invention can be characterised in that it is present

- (i) as DNA or
- (ii) as RNA corresponding to (i) or
- (iii) as PNA,

the nucleic acid molecule where appropriate having been modified in a manner known *per se* for analytical detection processes, especially those based on hybridisation and/or amplification.

Thus, a nucleic acid molecule according to the invention can have been modified in such a manner that up to 20% of the nucleotides

of at least 10 successive nucleotides of its nucleotide chain, especially 1 or 2 nucleotides, have been replaced by analogous building blocks known *per se* as probes and/or primers, especially by nucleotides that do not occur naturally in bacteria.

The nucleic acid molecule according to the invention can also have been modified or labelled or additionally modified or labelled in such a manner that it comprises, in a manner known *per se* for analytical detection processes, one or more radioactive groups, coloured groups, fluorescent groups, groups for immobilisation on a solid phase and/or groups for an indirect or direct reaction, especially for an enzymatic reaction, preferably using antibodies, antigens, enzymes and/or substances having an affinity for enzymes or enzyme complexes, and/or otherwise modifying or modified groups of nucleic-acid-like structure.

According to a further embodiment, the problem underlying the invention is solved by a kit for analytical detection processes, especially for the detection of bacteria of the *Pseudomonas* genus, that kit being characterised by one or more nucleic acid molecules according to the invention.

According to a further embodiment, the problem underlying the invention is solved by use of one or more nucleic acid molecules according to the invention or of a kit according to the invention for detection of the presence or absence of bacteria belonging to a group of bacteria of the *Pseudomonas* genus.

The use according to the invention can be characterised in that the group of bacteria of the *Pseudomonas* genus includes various strains of *Pseudomonas aeruginosa* or is made up from those strains.

Such use according to the invention can be characterised in that the group of bacteria of the *Pseudomonas* genus is composed exclusively of *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Use according to the invention can also be characterised in that nucleic acid hybridisation and/or nucleic acid amplification is/are carried out.

Use according to the invention can also be characterised in that, as nucleic acid amplification, a polymerase chain reaction is carried out.

Use according to the invention can also be characterised in that the detection is carried out by distinguishing the to-be-detected bacteria from not-to-be-detected bacteria on the basis of differences in the genomic DNA and/or RNA at at least one nucleotide position in the region of a nucleic acid molecule according to the invention.

Use according to the invention can also be characterised in that distinguishing is carried out on the basis of differences in the region of a nucleic acid molecule of SEQ ID NO 1 or of its complementary sequence.

To detect specific microorganisms by means of nucleic acid hybridisation or amplification, organism-specific oligo-nucleotides are, therefore, used according to the invention. **Organism-specific oligonucleotides** are nucleic acids, from 10 to 250 bases (preferably from 15 to 30 bases) long, the base sequence of which is characteristic of a specific microorganism or a group of microorganisms. When using such organism-specific oligonucleotides (for example, as primers or probes) with the processes mentioned hereinbefore, hybridisation to DNA/amplification of DNA can take place, under suitable reaction conditions, only when the DNA of

the microorganisms to be detected in the particular case is present.

Prokaryotic ribosomes comprise three distinct nucleic acid components, which are generally known as 5S, 16S and 23S rRNA (ribosomal ribonucleic acid). The genetic information for those ribonucleic acids (rDNA) is arranged in the genome typically in the form of tandems. The organisation of such a unit is 16S-23S-5S, the three genes being separated from one another by short hypervariable intergenic regions. The units are present in the genome in several copies, it being possible for the number of the repeating units to vary in different bacteria. The high degree of conservation of the DNA sequence in the region of 16S rDNA, 23S rDNA and 5S rDNA across the entire kingdom of bacteria allows non-specific oligonucleotides to be designed, even without precise knowledge of the DNA sequences of the microorganisms to be investigated. Such non-specific oligonucleotides are characteristic of a relatively large group of microorganisms, which are generally phylogenetically related. By using those non-specific oligonucleotides it will be possible for the person skilled in the art, for example after appropriate preliminary tests by means of DNA amplification using PCR, to isolate rDNA fragments, for example the 23S/5S intergenic region, of any particular microorganism. By DNA sequencing, it is then possible to determine the sequence of the hypervariable intergenic regions of the microorganism in question.

DNA sequencing of the 23S/5S intergenic region of as large a number as possible of to-be-detected bacteria (e.g. of various *Pseudomonas* species), on the one hand, and subsequent comparison of those DNA sequences, on the other hand, allows DNA regions to be identified that in the group investigated (e.g. all *Pseudomonas* species) are not changed or only insignificantly changed.

DNA sequencing of the 23S/5S intergenic region of selected **not-to-be-detected** bacteria (e.g. bacteria that do not belong to the *Pseudomonas* genus), on the one hand, and subsequent comparison of those DNA sequences with the sequences of to-be-detected bacteria (e.g. various *Pseudomonas* species), on the other hand, allows DNA sequences to be identified that are characteristic of the to-be-detected bacteria (e.g. all *Pseudomonas* species). It is then possible to derive, from these DNA sequences, oligonucleotides that can be used as primers and/or probes in processes based on nucleic acids, with the aim of specifically detecting the group of bacteria in question (e.g. all species of the *Pseudomonas* genus).

The DNA sequences described in the present invention for detecting bacteria of the *Pseudomonas* genus, especially bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa*, are based on the 23S/5S intergenic region and the directly adjacent region of the 23S rDNA. The DNA sequence in that region was determined for a large number of bacteria. After exact sequence comparisons, organism-specific nucleic acid sequences were determined, which can be used for primers and/or probes for use in a species-/genus-specific detection process.

To detect the group of microorganisms in question, nucleic acids, preferably genomic DNA, are firstly released from the cells contained in a sample or bacterial culture to be investigated. By means of nucleic acid hybridisation, it is then possible - using the organism-specific oligonucleotides according to the invention as a probe - to **directly** detect organism-specific nucleic acid sequences in the sample to be investigated. Various processes known to the person skilled in the art are suitable for that purpose, such as, for example, "Southern blot" or "dot blot".

Preference is given, however, above all on account of the relatively high sensitivity, to an indirect detection process in

which the DNA/RNA sequences sought are firstly amplified by means of the above-mentioned processes for amplifying nucleic acids, preferably PCR.

The amplification of DNA/RNA using the processes mentioned can be effected by using organism-specific oligonucleotides as primers, specific amplification products being formed only when DNA/RNA of the to-be-detected microorganism is present. The specificity of the detection process can be increased by a subsequent detection reaction using organism-specific oligonucleotides as probes. For that subsequent detection reaction it is also possible to use non-specific oligonucleotides.

Alternatively, the nucleic acid amplification can also be carried out in the presence of one or more non-specific oligonucleotides, so that it is possible that DNA/RNA of other, not-to-be-detected microorganisms may also be amplified. Such an amplification process is generally less specific and should therefore be backed up by a subsequent detection reaction using one or more organism-specific oligonucleotide(s) as probe(s).

Various processes by which the amplification products formed in the indirect processes can be detected will be known to the person skilled in the art. These include, *inter alia*, visualisation by means of gel electrophoresis, the hybridisation of probes on immobilised reaction products [coupled to nylon or nitrocellulose filters ("Southern blots") or, for example, on beads or microtitre plates] and the hybridisation of the reaction products on immobilised probes (e.g. "reverse dot blots" or beads or microtitre plates coupled with probes).

A large number of different variants have been described by means of which organism-specific oligonucleotides (for example probes and primers) can be labelled or modified for the direct or indirect detection processes described. They may comprise, for exam-

ple, radioactive, coloured, fluorescent or otherwise modified or modifying groups, for example antibodies, antigens, enzymes or other substances having an affinity for enzymes or enzyme complexes. Probes and primers may be either naturally occurring or synthetically produced double-stranded or single-stranded DNA or RNA or modified forms of DNA or RNA, such as, for example, PNA (in these molecules the sugar units have been replaced by amino acids or peptides). Particular nucleotides or a number of nucleotides of the probes or primers may be replaced by analogous building blocks (such as, for example, nucleotides that do not naturally occur in the target nucleic acid). In the case of the above-mentioned indirect detection processes, detection can be carried out also by means of an internally labelled amplification product. That can be effected, for example, by integrating modified nucleoside triphosphates (for example, coupled with digoxigenin or fluorescein) during the amplification reaction.

Suitable organism-specific oligonucleotides according to the invention are nucleic acids, preferably from 10 to 250 bases and especially from 15 to 30 bases long, that correspond, at least in a 10 base long sequence, to Sequences 1 to 4 mentioned hereinbelow or to their complementary sequences. Relatively small differences (1 or 2 bases) in that 10 base long sequence are possible without the specificity mentioned in the particular case being lost in amplification and/or hybridisation. The person skilled in the art will know that in the case of such relatively small differences the reaction conditions will need to be altered accordingly; cf., for example, T. Maniatis, Molecular Cloning, Editors G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

The sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) in the region of the 23S/5S intergenic region is:

(Sequence 1 = SEQ ID NO 1))

ATAAACACCAAACAATCTGAYGATTGTGTGTAAGGTGAAGTCGACGAACCGAAAGTCGC
ATGAACCGCAAACACCTTGAAATCACATACCTGAATCCGGATAGACGTAAGCCCAAGCGAACG
GATAT

In addition, the sequence in the region of the 23S/5S intergenic region was determined for 6 further strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* and for at least one strain of each of the following species: *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas citronellosis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*. The sequence comparisons showed that a number of oligonucleotides derived from Sequence 1 are suitable for the selective detection of bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa*. The sequence of the region (12-131) is suitable for such organism-specific oligonucleotides.

From Sequence 1 there were derived the following oligonucleotides, which are especially suitable as primers for PCR (Sequence 3) and as a probe (Sequence 4).

Oligonucleotide Pa1 (Sequence 2) corresponds to position 2823-2842 of a 23S rRNA gene of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 [Toschka et al. (1987), Nucleic Acids. Res. 15, 7182]:

Oligonucleotide Pa1: (Sequence 2 = SEQ ID NO 2) 5'-
GATAGGCTGGGTGTGTAAGC-3'

Oligonucleotide Pa2: (Sequence 3 = SEQ ID NO 3) 5'-
CTGGGCTTACGTCTATCCG-3'

Oligonucleotide Pa3: (Sequence 4 = SEQ ID NO 4) 5'-
TTCAGGTATGTGATTCAAG GTG-3'

Example 1: Detection of bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa* using the polymerase chain reaction

DNA was isolated by standard processes from pure cultures of the bacteria listed in Table 1. Approximately from 10 to 100 ng of each of those DNA preparations was then used in the PCR in the presence of 0.4 µM of each of oligonucleotide Pa1 and Pa2, 200 µM of dNTP's (Boehringer Mannheim), 4 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris/HCl (pH 8.8), 0.01% Tween 20 and 0.03 U/µl Taq-polymerase (Biomaster). The PCR was carried out in a Perkin-Elmer 9600 (Pa1 and Pa2)/Biometra TRIO-Thermoblock (Pa4 and Pa2) thermocycler using the following thermoprofiles:

- initial denaturing	95°C	5 min
- 1st amplification (15 cycles)	94°C	35 sec
	68°C	30 sec
	72°C	30 sec
- 2nd amplification (20 cycles)	94°C	35 sec
	64°C	30 sec
	72°C	30 sec
- final synthesis	72°C	5 min

After the end of the PCR reaction, the amplification products were separated by means of agarose gel electrophoresis and visualised by staining with ethidium bromide. The expected product having a length of 191 bp was observed only in those cases in which DNA of strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* was present (compare Table 1), but not in the presence of DNA of other tested bacteria. After the end of the run, the DNA contained in the gels was transferred by standard methods to nylon filters and hybridised with the oligonucleotide Pa3 (Sequence 4)

biotinylated at the 5' terminus, in order to check the specificity. Hybridisation was effected in 5 x SSC, 2 % blocking reagent, 0.1 % lauryl sarcosine, 0.02 % SDS and 5 pmol/ml of probe for 4 hours at 48°C. Washing was carried out in 2 x SSC, 0.1 % SDS for 2 x 5 minutes at room temperature and in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS for 1 x 15 minutes at 48°C. Detection was carried out according to standard methods using alkaline phosphatase conjugates (Extravidin, SIGMA, # E-2636) in the presence of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and 4-nitro-blue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim).

A band was observed on the filters only in those cases in which a band had previously been visible on the agarose gel (see Table 1). Thus, the presence of all the 82 tested *Pseudomonas aeruginosa* strains was detected by PCR and, partially, by hybridisation. In contrast, none of the tested bacterial strains not belonging to that species was detected using this system.

Table 1: Results of PCR amplification using the oligonucleotides Pa1 and Pa2 (SEQ ID NO 2 and SEQ ID NO 3) and subsequent hybridisation using the oligonucleotide Pa3 (SEQ ID NO 4).

Species	Designation of strain	PCR	Hybridisation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14886	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15522	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15691	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15692	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21472	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21776	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33350	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33361	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33818	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33988	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 8029	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 288	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1253	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1299	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 682	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4283	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4880	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4937	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4938	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5258	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5594	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5595	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5596	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5597	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5598	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5599	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5600	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5601	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5602	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5603	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5604	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5606	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5607	+	+

Species	Designation of strain	PCR	Hybridisation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5917	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5918	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5919	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5920	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5921	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5922	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5923	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5924	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5925	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5926	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5927	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5928	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5929	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5930	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5932	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5933	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5934	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7046	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7047	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7048	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7049	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7050	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7051	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7052	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7053	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7054	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7055	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7056	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7057	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7058	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7059	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7060	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7061	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7062	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7063	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7064	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7065	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7066	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7067	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7068	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7069	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7070	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7071	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7072	+	n.p.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7073	+	n.p.
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342	-	-
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 50254	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	BC 3134	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BC 1753	-	-
<i>Pseudomonas citronellosis</i>	DSM 50332	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228	-	-

Species	Designation of strain	PCR	Hybridisation
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 4882	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 2439	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456	-	-
<i>Pseudomonas indigofera</i>	BC 1105	n.p.	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	-	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM 1045	-	-
<i>Pseudomonas pickettii</i>	BC 3323	-	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	BC 4941	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 548	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (<i>ovalis</i>)	ATCC 950	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BC 4940	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 10604	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSM 4593	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-	-
<i>Escherichia hermanii</i>	DSM 4560	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BC 5362	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	BC 4700	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2024	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	BC 5950	-	-
<i>Salmonella Anatum</i>	BC 2284	-	-

BC: BioteCon strain collection; n.p.: Hybridisation was not performed.

Patent claims

1. Nucleic acid molecule obtainable by starting from a plurality of strains belonging to, on the one hand, a to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus and, on the other hand, not-to-be-detected bacteria,
 - (a) isolating, in a manner known *per se*, genomic DNA from a strain of the mentioned bacteria (first strain),
 - (b) amplifying, in a manner known *per se*, the 23S/5S intergenic region, optionally together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (first amplification product),
 - (c) in accordance with steps (a) and (b) in each case, isolating genomic DNA using a second, third, . . . and/or nth strain of the mentioned bacteria, amplifying the 23S/5S intergenic region, together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (second, third, . . . nth amplification product),
 - (d) determining, in a manner known *per se*, the DNA sequence of amplification products obtained according to (b) and (c), and comparing the DNA sequence of the amplification product according to (b) with the DNA sequence of one or more amplification products according to (c), and
 - (e) isolating and obtaining, as a primer or probe, a nucleic acid molecule by means of which the to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus can be distinguished from not-to-be-detected bacteria, on the basis of differences at at least one nucleotide position in the sequence region of the nucleic acid molecule.
2. Nucleic acid molecule according to claim 1, obtainable by starting from strains belonging to, on the one hand, to-be-detected bacteria of the *Pseudomonas* genus and, on the other

hand, not-to-be-detected bacteria of a genus (genera) other than *Pseudomonas*.

3. Nucleic acid molecule obtainable by starting from a plurality of strains belonging to a to-be-detected group and a not-to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus,

- (a) isolating, in a manner known *per se*, genomic DNA from a *Pseudomonas* strain of those groups (first strain),
- (b) amplifying, in a manner known *per se*, the 23S/5S intergenic region, optionally together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (first amplification product),
- (c) in accordance with steps (a) and (b) in each case, isolating genomic DNA using a second, third, . . . and/or n^{th} *Pseudomonas* strain of those groups, amplifying the 23S/5S intergenic region, together with the directly adjacent 23S region and/or the directly adjacent 5S region, and obtaining the amplification product (second, third, . . . n^{th} amplification product),
- (d) determining, in a manner known *per se*, the DNA sequence of amplification products obtained according to (b) and (c), and comparing the DNA sequence of the amplification product according to (b) with the DNA sequence of one or more amplification products according to (c), and
- (e) isolating and obtaining, as a primer or probe, a nucleic acid molecule by means of which the to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus can be distinguished from the not-to-be-detected group of bacteria of the *Pseudomonas* genus on the basis of differences at at least one nucleotide position in the sequence region of the nucleic acid molecule.

4. Nucleic acid molecule according to claim 3, obtainable by starting from strains belonging to a to-be-detected group of bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa* and a not-to-be-detected group of bacteria of other *Pseudomonas* species.

5. Nucleic acid molecule of SEQ ID NO 1 or the sequence complementary thereto.

6. Nucleic acid molecule having a shortened sequence compared with a nucleic acid molecule according to claim 5, namely the sequence of the region or in the region of the nucleotide positions 12 to 131.

7. Nucleic acid molecule having a shortened sequence compared with a nucleic acid molecule according to claim 5, namely

(i) SEQ ID NO 3 or

(ii) SEQ ID NO 4 or

(iii) the sequence complementary to each of (i) and (ii).

8. Nucleic acid molecule of SEQ ID NO 2 or the sequence complementary thereto.

9. Nucleic acid molecule characterised in that, in respect of its sequence in at least 10 successive nucleotides of its nucleotide chain,

(i) it is identical to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims or

(ii) it corresponds to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims in 9 out of 10 successive nucleotides or

(iii) it corresponds to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims in 8 out of 10 successive nucleotides or

(iv) it is at least 90 % homologous to a nucleic acid molecule according to one of the preceding claims.

10. Nucleic acid molecule according to claim 9, characterised in that it is from 10 to 250, and preferably from 15 to 30, nucleotides long.

11. Nucleic acid molecule according to one of the preceding claims, characterised in that it is single-stranded or double-stranded.

12. Nucleic acid molecule according to one of the preceding claims, characterised in that it is present

- (i) as DNA or
- (ii) as RNA corresponding to (i) or
- (iii) as PNA,

the nucleic acid molecule where appropriate having been modified in a manner known *per se* for analytical detection processes, especially those based on hybridisation and/or amplification.

13. Nucleic acid molecule according to claim 12, characterised in that the nucleic acid molecule has been modified in such a manner that up to 20 % of the nucleotides of at least 10 successive nucleotides of its nucleotide chain, especially 1 or 2 nucleotides, have been replaced by analogous building blocks known *per se* as probes and/or primers, especially by nucleotides that do not occur naturally in bacteria.

14. Nucleic acid molecule according to claim 12 or 13, characterised in that the nucleic acid molecule has been modified or labelled or additionally modified or labelled in such a manner that it comprises, in a manner known *per se* for analytical detection processes, one or more radioactive groups, coloured groups, fluorescent groups, groups for immobilisation on a solid phase and/or groups for an indirect or direct reaction, especially for an enzymatic reaction, preferably using antibodies, antigens, enzymes and/or substances having an affinity for enzymes or enzyme complexes, and/or otherwise modifying or modified groups of nucleic-acid-like structure.

15. Kit for analytical detection processes, especially for detection of bacteria of the *Pseudomonas* genus, characterised in that one or more nucleic acid molecule according to one of the preceding claims.

16. Use of one or more nucleic acid molecules according to one of claims 1 to 14 or in the form of a kit according to claim 15 for detection of the presence or absence of bacteria belonging to a group of bacteria of the *Pseudomonas* genus.

17. Use according to claim 16, characterised in that the group of bacteria of the *Pseudomonas* genus includes various strains of *Pseudomonas aeruginosa* or is made up from those strains.

18. Use according to claim 17, characterised in that the group of bacteria of the *Pseudomonas* genus is composed exclusively of *Pseudomonas aeruginosa* strains.

19. Use according to one of claims 16 to 18, characterised in that a nucleic acid hybridisation and/or a nucleic acid amplification is/are carried out.

20. Use according to claim 19, characterised in that, as nucleic acid amplification, a polymerase chain reaction is carried out.

21. Use according to one of claims 16 to 20, characterised in that the detection is carried out by distinguishing the to-be-detected bacteria from not-to-be-detected bacteria on the basis of differences in the genomic DNA and/or RNA at at least one nucleotide position in the region of a nucleic acid molecule according to one of claims 1 to 14.

22. Use according to claim 21, characterised in that distinguishing is carried out on the basis of differences in the region of a nucleic acid molecule according to claim 5.

Abstract

The present invention relates to a nucleic acid molecule or molecules and to a process for the detection of bacteria of the *Pseudomonas* genus, especially *Pseudomonas aeruginosa*. The invention relates also to a test kit or kits for carrying out the said detection processes.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die BIOTECON Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nucleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas"

am 9. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 12 Q und C 12 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. September 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Hoiß

Wenzeichen: 197 39 611.9

BOETERS & BAUER
PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
BEREITERANGER 15
D - 81541 MÜNCHEN

PAO BOETERS & BAUER
BEREITERANGER 15, D-81541 MÜNCHEN

DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPL.-ING. ROBERT BAUER
PHYS. DR. ENNO MEYER
TELEFON: (089) 65 00 86
TELEFAX: (089) 65 39 62

9. September 1997/p1

Unser Zeichen: 8872
Neue deutsche Patentanmeldung
Biotecon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und
Consulting mbH

**Nucleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von
Bakterien der Gattung *Pseudomonas***

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle für *Pseudomonas*-Nachweis, einen Kit sowie deren Verwendungen.

Allgemeiner Hintergrund der Erfindung

Das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein weit-verbreitetes, für den Menschen pathogenes Bakterium, das vor allem für Neugeborene und abwehrgeschwächte Menschen ein hohes gesundheitliches Risiko darstellt. Neben seiner hohen klinischen Relevanz, der häufig vorhandenen Antibiotikaresistenzen und der Bildung von Toxinen, insbesondere des hochgiftigen Exotoxins A (Woods, D.E. and Iglesias, B.H., Rev. Infect. Diss. 5, 714-722 (1983)), ist *Pseudomonas aeruginosa* einer der bedeutendsten, bakteriellen Verursacher von Lebensmittelvergif-

tungen. Für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* werden mittels konventioneller Verfahren mindestens 4 Tage benötigt. Die Entwicklung schneller Nachweisverfahren von *Pseudomonas aeruginosa* in Lebensmitteln und klinischen Proben ist daher dringend erforderlich.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Erfassung einzelner Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen und Verfahren, bei denen Nucleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nucleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nucleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Patente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Qβ RNA-Replikasse-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt oder stark verkürzt werden kann. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit des jeweiligen Mikroorganismus ist daher bei Anwendung der genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis in der Regel innerhalb eines Tages abgeschlossen. Insbesondere wenn für den Nachweis mittels konventioneller Verfahren mehrere Tage bis

Wochen benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

Es sind verschiedene Verfahren auf PCR-Basis zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben. Mittels Amplifikation einer 369 bp langen DNA-Region aus dem Exotoxin A-Gen konnte selektiv die Anwesenheit von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Zwar wurden mit diesem PCR-System keine Bakterien anderer Spezies erfaßt, jedoch konnte nur bei 96% der insgesamt 130 getesteten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ein Amplifikat beobachtet werden. Dieses PCR-System ist somit nur bedingt für die Etablierung eines Schnellverfahrens geeignet, mit dem die Anwesenheit aller Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe eines weiteren, kürzlich veröffentlichten, auf einer Multiplex-PCR basierenden Verfahrens gelang der selektive Nachweis von fluoreszierenden *Pseudomonaden* einerseits und *Pseudomonas aeruginosa* andererseits [De Vos et al (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Jedes der insgesamt 150 getesteten Isolate von *Pseudomonas aeruginosa* konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Nachteilig ist jedoch, daß das für die selektive Erfassung von *Pseudomonas aeruginosa* herangezogene oprL-Gen auch in anderen Spezies der Gattung *Pseudomonas* hochkonserviert ist. So sind die Aminosäuren, die im Bereich der Bindungsstellen der von Voss et al. verwendeten Primer kodiert werden, in *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa* identisch. Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beruht somit lediglich auf einigen wenigen unterschiedlichen Basenpaaren bedingt durch die Variation der dritten Position einzelner Aminosäurecodons. Dies birgt erfahrungsgemäß eine große Gefahr des Auftretens von falsch-positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen.

Wochen benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

Es sind verschiedene Verfahren auf PCR-Basis zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben. Mittels Amplifikation einer 369 bp langen DNA-Region aus dem Exotoxin A-Gen konnte selektiv die Anwesenheit von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Zwar wurden mit diesem PCR-System keine Bakterien anderer Spezies erfaßt, jedoch konnte nur bei 96% der insgesamt 130 getesteten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ein Amplifikat beobachtet werden. Dieses PCR-System ist somit nur bedingt für die Etablierung eines Schnellverfahrens geeignet, mit dem die Anwesenheit aller Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe eines weiteren, kürzlich veröffentlichten, auf einer Multiplex-PCR basierenden Verfahrens gelang der selektive Nachweis von fluoreszierenden *Pseudomonaden* einerseits und *Pseudomonas aeruginosa* andererseits [De Vos et al (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Jedes der insgesamt 150 getesteten Isolate von *Pseudomonas aeruginosa* konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Nachteilig ist jedoch, daß das für die selektive Erfassung von *Pseudomonas aeruginosa* herangezogene oprL-Gen auch in anderen Spezies der Gattung *Pseudomonas* hochkonserviert ist. So sind die Aminosäuren, die im Bereich der Bindungsstellen der von Voss et al. verwendeten Primer kodiert werden, in *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa* identisch. Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* beruht somit lediglich auf einigen wenigen unterschiedlichen Basenpaaren bedingt durch die Variation der dritten Position einzelner Aminosäurecodons. Dies birgt erfahrungsgemäß eine große Gefahr des Auftretens von falsch-positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen.

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der *oprI* und *oprL*-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung *Pseudomonas* nachzuweisen, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas stutzeri*.

Ziel der hier dargestellten Erfundung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfundung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung *Pseudomonas* ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung *Pseudomonas* zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differenziellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa* möglich ist.

Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch

gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Stamm der genannten Bakterien (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 5S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),

(c) mit einem zweiten, dritten, . . . und/oder nten Stamm der genannten Bakterien jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S-intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, . . . ntes Amplifikationsprodukt),

- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c)

vergleicht und (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfundungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisen-den Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht

nachzuweisenden Bakterien eines anderen Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zu- grundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt, (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition vergleicht und

tion im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer *Pseudomonas*-Species angehören.

- (a) die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber dem vorstehenden Nucleinsäuremolekül verkürzten Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
- Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber einem Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 verkürzten Sequenz, nämlich
 - (i) der SEQ ID NO 3 oder
 - (ii) der SEQ ID NO 4 oder
 - (iii) der zu (i) und (ii) jeweils komplementären Sequenz.
- Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
 - (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
 - (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem

Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

(iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

(iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

So kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert sein, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ferner kann das erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert sein, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Kit für analytische Nachweisverfahren gelöst, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, wobei der Kit gekennzeichnet ist durch ein oder mehrere erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküle.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zu-
grundeliegende Aufgabe durch eine Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßigen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien gelöst, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.

Die erfindungsgemäß Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.

Eine derartige erfindungsgemäß Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der

Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

Ferner kann eine erfindungsgemäß Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäß Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäß Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines erfundungsgemäß Nucleinsäuremoleküls unterscheidet.

Ferner kann eine erfindungsgemäß Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz unterscheidet.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nucleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden erfundungsgemäß also keimspezifische Oligonukleotide eingesetzt. Keimspezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30 Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für einen spezifischen Mikroorganismus oder eine Gruppe von Mikroorganismen ist. Eine Hybridisierung an DNA bzw. eine Amplifikation von DNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen,

nur dann erfolgen, wenn die DNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Prokaryontische Ribosomen beinhalten drei distinkte Nucleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Ribonucleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonucleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise in Form von Tandems angeordnet. Die Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die drei Gene durch kurze hypervariable intergenische Regionen voneinander getrennt sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten in verschiedenen Bakterien variieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz im Bereich der 16S rDNA, der 23S rDNA und der 5S rDNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von nicht-spezifischen Oligonukleotiden auch ohne genaue Kenntnis der DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Mikroorganismen. Solche nicht-spezifischen Oligonukleotide sind charakteristisch für eine größere, in der Regel phylogenetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Durch Einsatz dieser nicht-spezifischen Oligonukleotide gelingt dem Fachmann, z.B. nach entsprechenden Versuchen durch DNA-Amplifikation mittels PCR, die Isolation von rDNA-Fragmenten, z.B. der 23S/5S intergenischen Region eines beliebigen Mikroorganismus. Durch DNA-Sequenzierung kann dann die Sequenz der hypervariablen intergenischen Regionen des betreffenden Mikroorganismus bestimmt werden.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl nachzuweisender Bakterien (z.B. von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Bereichen, die in der untersuchten Gruppe (z.B.

alle *Pseudomonas*-Spezies) nicht oder nur unwesentlich verändert ist.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region ausgewählter nicht-nachzuweisender Bakterien (z.B. Bakterien die nicht zur Gattung *Pseudomonas* gehören) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit der Sequenz der nachzuweisenden Bakterien (z.B. verschiedener *Pseudomonas*-Spezies) andererseits erlaubt das Auftreten von DNA-Sequenzen, die für die nachzuweisenden Bakterien (z.B. alle *Pseudomonas*-Spezies) charakteristisch sind. Aus diesen DNA-Sequenzen können wiederum Oligonukleotide abgeleitet werden, die als Primer und/oder Sonden in auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren einsetzbar sind, mit dem Ziel, die jeweilige Gruppe von Bakterien (z.B. alle Spezies der Gattung *Pseudomonas*) spezifisch nachzuweisen.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen DNA-Sequenzen zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, basieren auf der 23S/5S intergenischen Region und dem direkt angrenzenden Bereich der 23S rDNA. Die DNA-Sequenz in dieser Region wurde für eine Vielzahl von Bakterien bestimmt. Nach exakten Sequenzvergleichen wurden keimspezifische Nucleinsäuresequenzen bestimmt, für Primer und/oder Sonden für einen Einsatz in einem Spezies-/Genus-spezifischen Nachweisverfahren benutzt werden können.

Zum Nachweis der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen werden Nucleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nucleinsäure-hybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von kein-

spezifischen Nucleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren kann unter Einsatz von keimspezifischen Oligonukleotiden als Primer erfolgen. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA des nachzuweisenden Mikroorganismus anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von keimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht-keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nucleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren keimspezifischen Oligonukleotid(en) als Sonde(n) abgesichert werden.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.a. die Visuali-

sierung mittels Gelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte (gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten) und die Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varianten beschrieben, mit denen **keimspezifische Oligonukleotide** (z.B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nucleinsäure nicht natürliche vorkommen) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen

langen Sequenz mit den unten angegebenen Sequenzen 1 bis 4 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Manatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder an-

der 23S/5S intergenischen Region lautet:

(Sequenz 1 = SEQ ID NO 1)

ATAACACCCAAACAATCTGAYATTGTGTAAAGGTGAAGTCCGCAACCGAACGATGATAT

Außerdem wurde die Sequenz im Bereich der 23S/5S-intergenischen Region für 6 weitere Stämme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* sowie für mindestens je einen Stamm der folgenden Spezies bestimmt: *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas citronellosis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß sich mehrere, von Sequenz 1 abgeleitete Oligonukleotide für den selektiven Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* eignen. Geeignet für solche keimspezifischen Oligonukleotide ist die Sequenz der Region (12-131).

Von Sequenz 1 wurden folgende, als Primer für die PCR (Sequenz 3) und als Sonde (Sequenz 4), besonders geeignete Oligonukleotide abgeleitet.

Oligonukleotid Pa1 (Sequenz 2) entspricht Position 2823-2842 eines 23S rRNA-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 [Toschka et al. (1987), Nucleic Acids. Res. 15, 7182]:

Oligonukleotid Pa1: (Sequenz 2 = SEQ ID NO 2) 5' - GATAGGCTGGGTGTAAGC-3'

Oligonukleotid Pa2: (Sequenz 3 = SEQ ID NO 3) 5' - CTTGGCTTACGCTATCCG-3'

Oligonukleotid Pa3: (Sequenz 4 = SEQ ID NO 4) 5' - TTCAAGTATCG-3'
TGATTCAAG GTG-3'

Beispiel 1: Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid Pa1 und Pa2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 4 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01 % Tween 20 und 0,03 U/µl Tag-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

- initiale Denaturierung	95 °C	5 min
- 1. Amplifikation (15 Zyklen)	94 °C	35 sek
	68 °C	30 sek
	72 °C	30 sek

- 2. Amplifikation (20 Zyklen)

94 °C
35 sek

64 °C
30 sek

72 °C
30 sek

- finale Synthese

72 °C
5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Das erwartete Produkt von 191 bp Länge wurde nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* anwesend war (vergleiche Tabelle 1), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien. Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standardmethoden auf Nylon-Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotid Pa3 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 48 °C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 5 min bei Raumtemperatur und in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für 1 x 15 min bei 48 °C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugate (Extravidin, Fa SIGMA, # E-2636) in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1). Somit wurde mittels PCR und teilweise auch mittels Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher der 82 getesteten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme nachgewiesen. Hingegen

wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1: Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden Pal und Pa2 (SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) und nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid Pa3 (SEQ ID NO 4)

Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14886	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15522	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15691	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15692	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21472	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21776	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33350	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33361	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33818	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33988	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 8029	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 288	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 919	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1253	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1299	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 682	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 1233	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4880	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4937	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 4938	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5238	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5594	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5595	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5596	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5597	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5601	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5602	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5598	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5599	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5600	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5601	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5602	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5603	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5604	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5605	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5607	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5917	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5918	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5919	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5920	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5921	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5922	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5923	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5924	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5925	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5926	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5927	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5928	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5929	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5930	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5932	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5933	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 5934	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7046	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7047	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7048	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7049	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7050	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7051	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7052	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7053	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7054	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7055	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7056	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7057	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7058	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7059	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7060	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7061	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7062	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7063	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7064	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7065	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7066	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7067	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7068	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7069	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7070	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7071	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7072	+	n. d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BC 7073	+	n. d.
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342	-	-
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 5054	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	BC 3134	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BC 1753	-	-
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	DSM 50332	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228	-	-

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 4882	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BC 2439	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456	-	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	-	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM 1045	-	-
<i>Pseudomonas pickettii</i>	BC 3323	-	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	BC 4941	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 548	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (ovalis)	ATCC 950	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BC 4940	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 10604	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSM 4593	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-	-
<i>Escherichia hermanni</i>	DSM 4560	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BC 5362	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	BC 4700	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2024	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	BC 5950	-	-
<i>Salmonella Anatum</i>	BC 2284	-	-

BC: BioteCon-Stammsammlung, n.d.: Hybridisierung wurde nicht durchgeführt.

- Patentansprüche
- Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,
 - an sich bekannter Weise aus einem Stamm der genannten Bakterien (erster Stamm) Genomische DNA isoliert,
 - an sich bekannter Weise die 23S/5S-Intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
 - mit einem zweiten, dritten, . . . und/oder nten Stamm der genannten Bakterien jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S-Intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, dritttes, . . . ntes Amplifikationsprodukt),
 - in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
 - als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

- zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.
 3. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* angehören,
 - (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
 - (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
 - (c) mit einem zweiten, dritten,..... und/oder nten *Pseudomonas*-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ntes Amplifikationsprodukt),
 - (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
 - (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-
 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer *Pseudomonas*-Species angehören.
 5. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
 6. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
 7. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, nämlich
 - (i) der SEQ ID NO 3 oder
 - (ii) der SEQ ID NO 4 oder
 - (iii) der zu (i) und (ii) jeweils komplementären Sequenz.
 8. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
 9. Nucleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
 - (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
 - (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem

Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

(iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

(iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

11. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

12. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es

- als DNA oder
- als (i) entsprechende RNA
- als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

13. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

- Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.
- Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, gekennzeichnet durch ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.
- Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder eines Kits gemäß Anspruch 15 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.
- Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.
- Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch **gekennzeichnet**, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 unterscheidet.

20. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch **gekennzeichnet**, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 5 unterscheidet.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.